

ESTUDIO HISTOLOGICO DEL HEPATOPANCREAS DE *THAIS HAEMASTOMA* (GASTROPODA, PROSOBRANCHIA).

HISTOLOGICAL STUDY ON THE MIDGUT GLAND OF *THAIS HAEMASTOMA* (GASTROPODA, PROSOBRANCHIA).

M.R.Rubio, P. Tineo, J. Díaz-Mayans y G. Tapia*

Palabras Clave: Hepatopáncreas, gasterópodos, *Thais*, ultraestructura.

Key Words: Hepatopáncreas, midgut gland, gastropods, *Thais*, ultrastructure.

RESUMEN

Thais haemastoma, Gasterópodo marino muy frecuente en las zonas rocosas del litoral mediterráneo, está presente tanto en medios conservados como contaminados, resultando resistente a la presencia de diversos tipos de xenobióticos y entre ellos los metales pesados. Dado que el hepatopáncreas de Crustáceos y Moluscos está directamente implicado en el metabolismo de muy distintas sustancias, se pretende analizar la ultraestructura de sus componentes celulares en condiciones normales, para así seleccionar un modelo celular que permita demostrar la presencia en el medio ambiente de metales pesados. Tras el estudio ultraestructural y análisis funcional de los cuatro tipos celulares hepatopancreáticos, se proponen las células acumuladoras de cationes como modelo experimental más apto para el estudio del metabolismo de metales pesados.

ABSTRACT

Thais haemastoma is an abundant Gastropod in the rocky shores of the West Mediterranean, occurring both in conserved and polluted environments; so this species results resistant to a variety of xenobiotics, including heavy metals. The Molluscan and Crustacean hepatopancreas has been recognized as an organ directly implied in the metabolism of many toxics; so, we intend to analyze the ultrastructural characteristics of the four hepatopancreatic cell types in order to select a cell model that allows to demonstrate the heavy metal presence in our marine coastal environment. The ultrastructural study and function analysis of the hepatopancreatic cells indicate that the cation containing cells are the most suitable cell model to study the heavy metals accumulation and metabolism.

INTRODUCCION

Desde hace algunos años, los moluscos se han venido utilizando como indicadores de contami-

nación en ambientes marinos, aplicándose para ello diversas técnicas de tipo ecológico, bioquímico o fisiológico. Actualmente se está procediendo a una renovación de las metodologías utilizadas en

* Departament de Biologia Animal. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València. 46100-Burjasot. València.

la evaluación del impacto ambiental provocado por la contaminación debida a la presencia de diferentes xenobióticos en el medio. Entre las nuevas técnicas propuestas, se encuentra en un nivel preferente el estudio de la histopatología de animales expuestos al contaminante estudiado, así como de la determinación de los cambios en la citoquímica debidos a tal exposición. Las técnicas histopatológicas se han utilizado extensamente sobre una gran variedad de animales marinos para describir e identificar aspectos patológicos atribuidos a diversos contaminantes ambientales (WOLFE, CLARK, FOSTER, HAWKES y MACLEOD, 1981; RASMUSSEN, HAGE y KARLOG, 1983). Así, por ejemplo, se ha determinado un incremento en la cantidad de lípidos, vacuolización de células digestivas y un incremento en la actividad lisosomal en moluscos bivalvos contaminados por petróleo (WOLFE *et al.*, 1981; CARLES, HENRY, SIRON y GIUSTI, 1986; BERTHOU, BALQUET, BODENNEC y MARCHAND, 1987). Otros muchos ejemplos se podrían citar, referidos a diversos contaminantes tales como metales pesados, pesticidas etc. pero, previo a los estudios toxicológicos, es necesario conocer la estructura normal del órgano u órganos a estudiar. En el presente trabajo se ha elegido como órgano de estudio el hepatopáncreas, dada su implicación directa en el metabolismo de muy diferentes sustancias y entre ellas, los xenobióticos. Así pues, lo que se pretende conseguir en este trabajo es, la descripción histológica y ultraestructural del hepatopáncreas y sus diversos tipos celulares.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de hepatopáncreas de ejemplares de *Thais haemastoma* procedentes de entornos no contaminados han sido fijadas en solución de

Karnowsky (glutaraldehído 1%, paraformaldehído 2% en tampón Sørensen 0,15 M, pH 7,2) durante dos horas a 4°C. La postfijación se ha llevado a cabo en tetróxido de osmio 1% en el mismo tampón por un periodo de dos horas a 4°C. Finalmente el material se ha incluido en araldita (Durcupan ACM) y seccionado en un ultramicrotomo JEOL-JUM7. Las secciones semifinas se han teñido con azul de toluidina y las ultrafinas con citrato de plomo (REYNOLDS, 1963).

El estudio y registro fotográfico de las muestras se ha llevado a cabo en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-800.

RESULTADOS

El hepatopáncreas de *Thais haemastoma* consiste en un conjunto de túbulos ciegos revestidos por un epitelio monoestratificado en el que se distinguen cuatro tipos celulares: células secretoras, células absorbentes, acumuladoras de cationes e indiferenciadas.

Las células secretoras (fig. 1) presentan un citoplasma apenas teñido en el que destacan gruesas granulaciones basófilas de tamaño constante y un núcleo de tamaño irregular, nucleolo muy evidente y cantidad media de heterocromatina, preferentemente periférica. A nivel ultraestructural (fig. 2), la porción citoplasmática perinuclear está ocupada por numerosos sáculos de retículo endoplásmico ribosómico de membranas paralelas, junto con mitocondrias y algún gránulo conteniendo material de densidad variable. El citoplasma periférico (fig. 3) presenta dilatación de los sacos del retículo endoplásmico ribosómico que muestra contenido granulofilamentoso de baja densidad. En sus proximidades es frecuente encontrar pequeños dictiosomas con contenido denso (fig. 4), así como gránulos de secreción en distintos momentos de su formación.

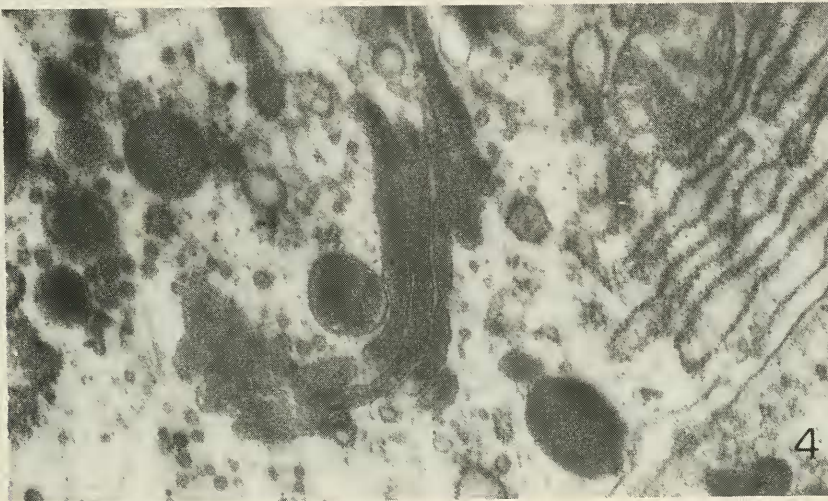
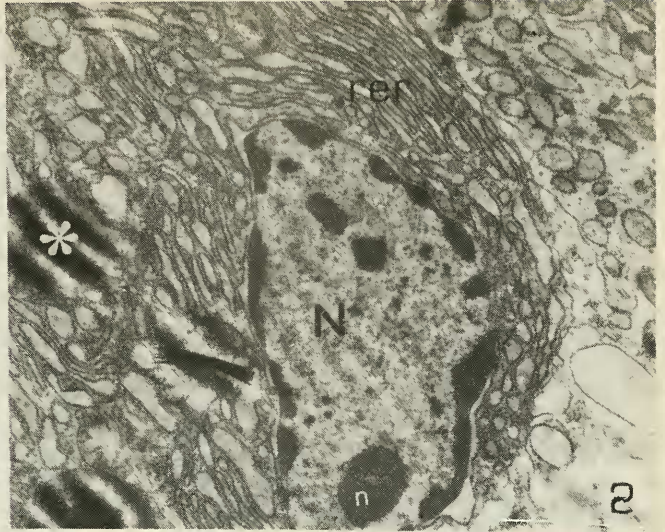
Fig. 1. Células secretoras. Gránulos de secreción (punta de flecha); núcleo (asterisco). 1000 X.

Fig. 2. Célula secretora: retículo endoplásmico ribosómico (rer); gránulos (asterisco); núcleo (N) y nucleolo (n). 10000 X.

Fig. 3. Célula secretora: sacos dilatados de RER (puntas de flecha); gránulos de secreción inmaduros (asterisco). 25000 X.

Fig. 4. Célula secretora: dictiosoma en proximidad a RER. 30000 X.

Fig. 5. Células absorbentes: vesículas con material de baja densidad (asteriscos); núcleo (n). 1000 X.



Las células de absorción se caracterizan por la gran cantidad de vesículas levemente acidófilas que ocupan la mayor parte del volumen celular (fig. 5); estas vesículas son de tamaño muy variable y dejan entre ellas una fina trama de matriz citoplasmática basófila. El núcleo, esférico u ovalado presenta escasa cantidad de heterocromatina y nucleolo muy visible. A nivel ultraestructural (fig. 6) destaca la presencia de microvellosidades en el borde apical de la célula, y mitocondrias, perfiles de retículo endoplásmico liso junto con cuerpos electrodensos en el citoplasma subapical.

Las células indiferenciadas (fig. 7) muestran un citoplasma basófilo que contiene casi exclusivamente ribosomas libres y mitocondrias. El núcleo de gran tamaño y contorno circular presenta muy escasa cantidad de heterocromatina y un nucleolo esférico y de gran tamaño; los poros de la envoltura nuclear son muy abundantes (fig. 8).

Las células acumuladoras de calcio presentan un citoplasma débilmente acidófilo en el que destacan gran número de granulaciones irregularmente basófilas y de tamaño variable (fig. 9); el núcleo redondeado u ovalado se localiza en la porción basal de las células y muestra un nucleolo prominente y baja condensación de la cromatina (fig. 10). Al microscopio electrónico, estas células presentan un desarrollo moderado de orgánulos, predominando las mitocondrias y el retículo endoplásmico ribosómico. Las granulaciones presentan diferentes aspectos estructurales variables en función de su grado de madurez, como puede apreciarse en las figs. 10 y 11, en general suele presentar una porción central electrodensa rodeada por un estrecho halo de menor densidad.

DISCUSION

La función principal del hepatopáncreas de Gasterópodos es la síntesis y secreción de enzimas digestivos, así como la absorción, acumulación y metabolismo de distintas sustancias (NAKAZIMA, 1956; OWEN, 1966). Estas funciones se encuentran distribuidas entre algunos de los tipos celulares que componen este órgano. Así, por datos ultraestructurales, las células secretoras parecen especializadas en la síntesis de proteínas; los datos histoquímicos obtenidos en *Deroce* (BABULA y SKOWRONSKA-WENLAND, 1988) y *Helix* (ROSENBAUM y DITZION, 1963) demuestran la existencia de fosfatasa ácida y esterasas inespecíficas en el interior de las vesículas citoplasmáticas de este tipo celular. Estos enzimas hidrolíticos son posteriormente vertidos a la luz tubular (KRYSZTOFIK, GLINIECKA y BIELAWSKI, 1983) interviniendo en la digestión extracelular.

Las células absorbentes, por sus características ultraestructurales (microvellosidades apicales, mitocondrias y sacos de retículo endoplásmico liso en el citoplasma subapical), deben estar implicadas en la absorción de materiales desde la luz tubular, así como su acumulación en las vesículas citoplasmáticas. Conclusiones similares se han obtenido en *Arion* y *Helix* (ORIVE, BERJON y OTERO, 1979). La presencia de fosfatasa alcalina en el citoplasma apical de estas células en *Deroce* (BABULA y SKOWRONSKA-WENLAND, 1988) así lo confirma. Además la abundancia de lisosomas en distintas fases de actuación, la interpretamos como consecuencia de la digestión intracelular del material absorbido, de acuerdo con la opinión de NAKAZIMA (1956).

Fig. 6. Célula absorbente. Microvellosidades apicales (mv); retículo endoplásmico liso (punta de flecha) mitocondrias y cuerpos electrodensos (asterisco). 15000 X.

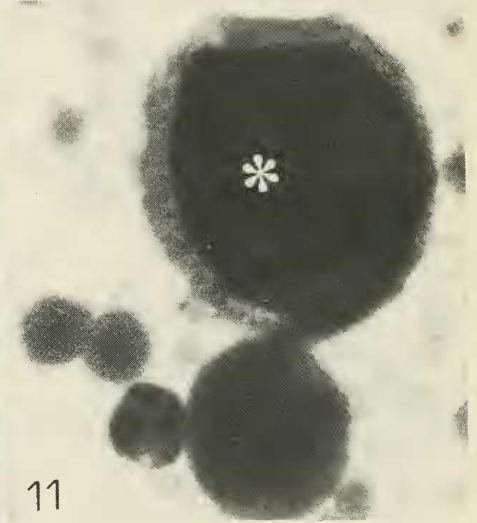
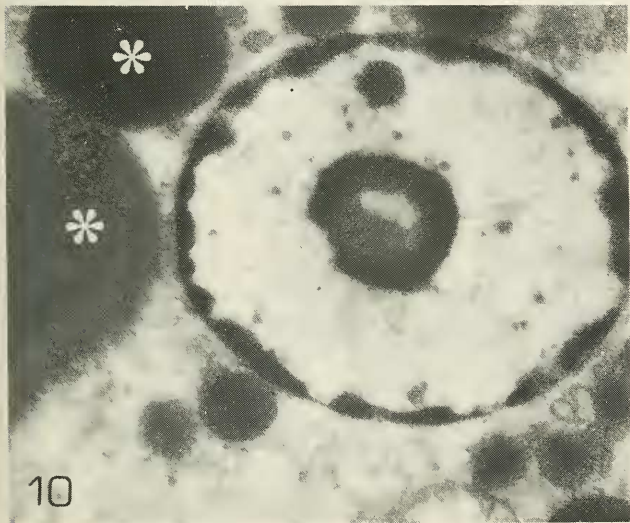
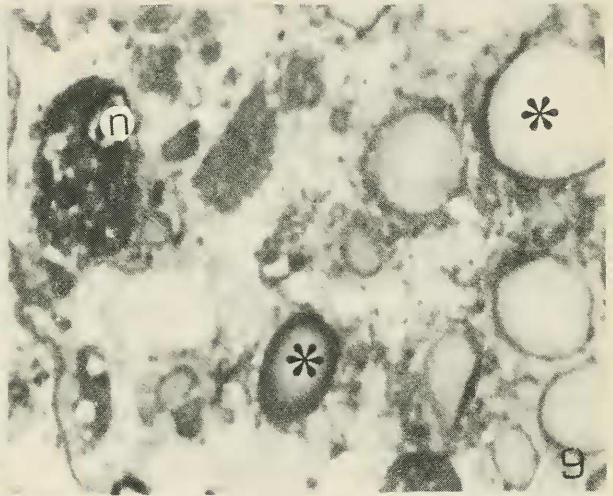
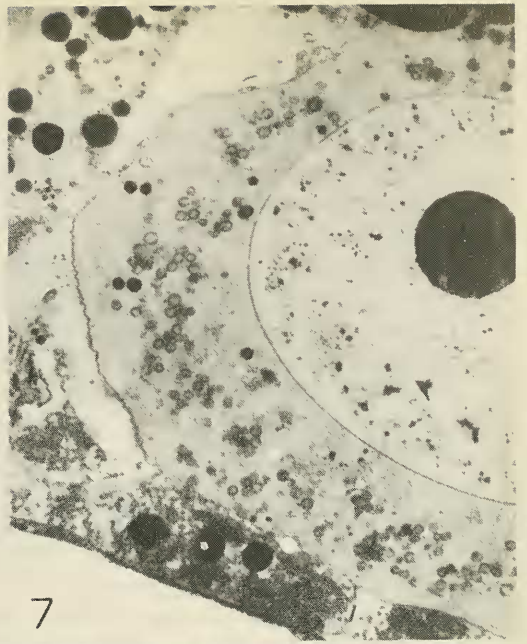
Fig. 7. Célula indiferenciada. 3000 X.

Fig. 8. Célula indiferenciada. Envoltura nuclear y poros (puntas de flecha). 15000 X.

Fig. 9. Células acumuladoras de cationes. Granulaciones de calcio (asterisco); núcleo (n). 1000 X.

Fig. 10. Célula acumuladora de cationes. Núcleo y gránulos de calcio en distintas etapas de formación (asteriscos). 10000X.

Fig. 11. Célula acumuladora de cationes. Gránulo de calcio maduro (asterisco). 25000 X.



Las células indiferenciadas parecen responsables de la renovación de los otros tipos celulares, probablemente según un mecanismo similar al que se da en las vellosidades intestinales.

Las células acumuladoras de cationes, contienen en sus vesículas o lisosomas (ANDRE y FAURE-FREMIET, 1967) además de cantidades importantes de calcio (ABOLINS-KROGIS, 1970) otros cationes, incluyendo hierro, cadmio y zinc (DURFORT, 1982, 1987; IRELAND, 1982) en moluscos procedentes de medios aparentemente no contaminados. En las granulaciones de este tipo celular se ha demostrado histoquímicamente la presencia de forfataza ácida (BOWEN, 1970) la cual podría estar relacionada con la utilización del calcio para la construcción y regeneración de la concha (ABOLINS-KROGIS, 1970; MASON y NOTT, 1981). Estos mismos lisosomas son lugares preferentes de acumulación de metales pesados tras exposición experimental a los mismos en Pulmonados (IRELAND, 1982) y Prosobranquios (*Littorina littorea*) (MARIGOMEZ, CAJARAVILLE y ANGULO, 1990; MARIGOMEZ y IRELAND, 1990; VEGA, MARIGOMEZ y ANGULO, 1989). Este tipo celular parece, pues, especialmente indicado para demostrar mediante estudios ultraestructurales, histoquímicos y de microanálisis, la presencia o no de metales en el medio ambiente mediterráneo, dada la abundancia de *T. haemastoma* en nuestras costas, así como su relativa tolerancia a la contaminación. Es necesario, no obstante, el estudio previo desde las tres metodologías citadas del efecto de la exposición experimental a distintos metales pesados sobre las células acumuladoras de cationes.

Trabajo parcialmente subvencionado por la DGICYT. Proyecto PB880349.

BIBLIOGRAFIA

- ABOLINS-KROGIS, A. 1970. Electron microscope studies of the intracellular origin and formation of calcifying granules and calcium spherites in the hepatopancreas of the snail *Helix pomatia* (L.). *Z. Zellforsch.*, 108:501-515.
- ANDRE, J. y FAURE-FREMIET, E. 1967. Formation et structure des concrétions calcaires chez *Prorodon morgani*, Kahl. *J. Microsc.*, 6: 391-398.
- BABULA, A. y SKOWRONSKA-WENDLAND, D. 1988. Histological and histochemical studies of the digestive system of the slug *Deroceras reticulatus* (Müller) (Pulmonata). *Bull. Soc. Amis Sci. Lett. Poznan.*, 26: 65-71.
- BERTHOUS, F., BALQUET, G., BODENNEC, G. y MARCHAND, M. 1987. The occurrence of hydrocarbons and histopathological abnormalities in oysters for seven years following the wreck of the Amoco Cadiz in Brittany (France). *Mar. Environ. Res.*, 23: 103-133.
- BOWEN, I.D. 1970. The fine structural localization of acid phosphatase in the gut epithelial cells of the slug, *Arion ater* (L.). *Protoplasma*, 70: 242-260.
- CARLES, D., HENRY, M., SIRON, M. y GIUSTI, G. 1986. Induction of ultrastructural alterations in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) by crude oil. In: Giam, C.S.; Dou, H.J.-M (eds). *Strategies and advanced techniques for Marine Pollution Studies: Mediterranean Sea*. NATO ASI Series, Vol. G9, Springer Verlag, Berlin. pp. 461-492.
- DURFORT, M. 1982. Las concreciones minerales del hepatopáncreas de *Trachydermon cinereus*, Thiele (Mollusca, Poliplaphora). Estudio ultraestructural. *Iberus*, 2: 1-17.
- DURFORT, M. 1987. Ultraestructura de las células vacuoladas "B" del hepatopáncreas de *Acanthochitona fascicularis* (L.). *Actas VIII Bienal R. Soc. Hist. Nat. Pamplona*. pp 227-238.
- IRELAND, M.P. 1982. Sites of water, zinc and calcium uptake and distribution of these metals after cadmium administration in *Arion ater* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol.*, 73: 217-221.
- KRYSZTOFIK, J., GLINIECKA, M. y BIELAWSKI, J. 1983. Soluble phosphatases in the hepatopancreas of the hibernating snail *Helix pomatia*, L. (Pulmonata). *Bull. Soc. Amis Sci. Lett. Poznan*, 23:37-43.
- MARIGOMEZ, J.A. y IRELAND, M.P. 1990. A laboratory study of cadmium exposure in *Littorina littorea* in relation to environmental cadmium and exposure time. *Sci. Total Environ.*, 90:75-87.
- MARIGOMEZ, J.A., CAJARAVILLE, M.P. y ANGULO, E. 1990. Cellular cadmium distribution in the common wrinkle, *Littorina littorea*, (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochem.*, 94: 191-199.
- MASON, A.Z. y NOTT, J.A. 1981. The role of intracellular biomineralized granules in the regulation and detoxification of metals in Gastropods with special reference to the marine Prosobranch *Littorina littorea*. *Aquat. Toxicol.*, 1:239-256.
- NAKAZIMA, M. 1956. On the structure and function of the midgut gland of the Mollusca, with a general consideration of the feeding habits and systematic relations. *Jap. J. Zool.*, 11: 469-566.
- ORIVE, E., BERJON, A. y OTERO, M.P.F. 1979. A comparative study of intestinal absorption in *Arion empiricorum* and *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 64: 557-563.
- OWEN, G. 1966. Digestion. In: *Physiology of Mollusca*. (Eds. Wilbur, K.M. and Yonge, C.M.). Vol. II, pp. 53-96. Acad. Press. New York.
- RASMUSSEN, L.P.D., HAGE, E. y KARLOG, O. 1983. Light and electron microscopic studies on the acute and chronic effects of N-nitrosodimethylamine. *Aquat. Toxicol.*, 3:285-299.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- ROSENBAUM, R.M. y DITZION, B. 1963. Enzymic histochemistry of granular components in digestive gland cells of the Roman snail *Helix pomatia*. *Biol. Bull.*, 124: 211-224.
- VEGA, M.M., MARIGOMEZ, J.A. y ANGULO, E. 1989. Quantitative alterations in the structure of the digestive cell of

Littorina littorea on exposure to cadmium. *Mar. Biol.*, 103: 547-553.

WOLFE, D.A., CLARK, R.C.; FOSTER, C.A.; HAWKES, J.W. y MACLEOD, W.D. 1981. Hydrocarbon accumulation and histopathology in bivalve mollusc trasplanted to the Baie de

Morlaix and the Rade de Brest. In: *Amoco Cadiz, fates and effects of the oil spill, Proceedings of the International Symposium*, Centre Oceanologique de Bretagne, Brest. pp.599-616.

